

AMEBİYAZ VE VİRULANS FAKTÖRLERİNİN ENTAMOEBA HISTOLYTICA PATOGENEZİNDEKİ ROLÜ

Amebiasis and the Role of Virulence Factors in *Entamoeba histolytica* Pathogenesis

Semra ÖZÇELİK¹, Erdoğan MALATYALI¹

¹Cumhuriyet Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Parazitoloji Anabilim Dalı
SİVAS

Geliş Tarihi: 09.10.2008
Kabul Tarihi: 29.12.2008

İletişim
Erdoğan MALATYALI
Cumhuriyet Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Parazitoloji Anabilim Dalı
58140, SİVAS
e-posta: emalatyali@yahoo.com

ÖZET

Amebiyaz, özellikle sanitasyonun eksik olduğu gelişmekte olan ülkelerde sık görülen önemli bir halk sağlığı problemidir. Hastalığın kliniği parazitin bağırsak yüzeyine ve diğer tabakalarına yayılmasıyla ortaya çıkar. Bununla birlikte parazit karaciğer, beyin gibi diğer organlara da yerleşerek apse oluşturabilir. Parazit genomunun dizilenmesi, antisens gen inhibisyonu ve gen susturulması gibi moleküler yöntemlerin kullanılması sonucu parazitin patogenezinin anlaşılmasında büyük gelişmeler sağlanmıştır. *E. dispar*' ın 1993'de morfolojik olarak benzer fakat apatojen bir tür olarak tanımlanmasından sonra, aralarındaki genomik düzeydeki farklar virülans faktörlerinin açıklanmasında önemli bir yer tutmaktadır. Son çalışmalar ışığında *E.histolytica*'da dört grup virülans faktörü tanımlanmıştır. Bunlar; adezyon molekülleri, amebaporlar, sistein proteinazlar ve lipofosfopeptidoglikan yüzey kompleksleridir. Bu faktörlerin lezyonun gelişimi sırasındaki rolleri bu derlemenin temel konusunu oluşturmaktadır. Ayrıca, parazit ve konak hücre etkileşimleri burada özetlenmiştir; bu etkileşimin açıklanması inflamasyon ve programlı hücre ölümünün gerçekleşmesindeki en önemli noktadır. Son yıllarda parazitin patogenezi hakkında daha fazla bilgi edinilmesine rağmen cevap bekleyen birçok soru bulunmaktadır. Bunların başında parazitin enkistasyonu, inflamasyon gelişimi, apoptotik ve nekrotik hücre ölümü gelmektedir. Ayrıca, parazitin yerleşim yerine göre farklı klinik belirtiler vermesi, açıklanması gereken bir diğer konudur. Bu nedenle, *E. histolytica* patogenezinin daha iyi anlaşılması için yeni çalışmalara ve gerçekçi hayvan modellerine ihtiyaç vardır.

Anahtar Sözcükler: *Entamoeba histolytica*, sistein proteinaz, amebapor, amebiyazis

ABSTRACT

Amebiasis is a parasitic disease of worldwide which has public health importance, particularly in developing countries having poor sanitary conditions. Clinical amebiasis results from the spread of trophozoites into the colon wall and beyond, and also the parasite may invade other organs such as liver, brain and causes abscess. Current development on *E. histolytica* pathogenesis is based on the publication of *E.histolytica* genome and using molecular techniques such as antisense inhibition of target gene expression and irreversible gene silencing. After characterization of *E. dispar* as a distinct species that is morphologically identical but apathogen in 1993, difference between two microorganisms in genomic level has revealed much information about virulence factors. In the light of recent studies, four virulence factors are defined; adhesion molecules, amoebapores, cysteine proteinases and complex lipophosphopeptidoglycans. The roles of these factors during invasion are the main concept of this review. Furthermore, interactions between parasite and host cell are summarized; this is the key point of understanding the role of inflammation and programmed cell death in the pathogenesis of amebiasis. Although we have learned much

about pathogenesis in recent years, there are still many unanswered questions. Most important ones of those questions are about encystation of parasite, inflammation process, apoptosis and necrotic cell death of host cells. In addition, how the parasite causes different clinical signs in different organs is another unexplained part in pathogenesis. Consequently, new studies and realistic animal models are needed to clarify the pathogenesis of *E. histolytica*.

Key Words: *Entamoeba histolytica*, cysteine proteinase, amoebapore, amoebiasis.



GİRİŞ

Amebiyaz, *Entamoeba histolytica*'nın bağırsak ve bağırsak dışı yerleşimi ve invazyonuyla oluşan paraziter bir hastalıktır. Her yıl 40.000 -100.000 arasında ölüme neden olan çoğunlukla kolon yerleşimli bu protozoon, nadiren karaciğer, akciğer ve beyin gibi organlara da yerleşerek apseye neden olur (1). Amebiyaz dünya çapında sıtmadan sonra ölümlerin en çok görüldüğü ikinci paraziter hastalıktır (2). Biyokimyasal, immunolojik ve moleküler genetik çalışmalar sonucunda morfolojik olarak aynı fakat genetik olarak farklı iki tür olduğu saptanmıştır. Patojen ve invaziv olan *E. histolytica* sensu strictu olarak adlandırılırken, noninvaziv ve apatojen olana *E. dispar* adı verilmiştir (3,4). Günümüzde, dünya nüfusunun yaklaşık % 10'nun bu iki türle enfekte olduğu, fakat bu sayının %90'ının morfolojik olarak *E. histolytica*' dan ayırt edilemeyen apatojen *E. dispar* türü olduğu tahmin edilmektedir. Ülkemizden bazı yayınlarda *E. histolytica/dispar* yaygınlığı % 0.5-17.6 arasında bildirilmiştir (5,6). Ancak *E. histolytica* yaygınlığının bu oranlardan daha düşük olabileceği ayırıcı tanı yöntemleriyle gösterilmiştir (7). Diğer paraziter hastalıklar gibi bu parazitoz da ülkemizde halen sanitasyon, alt yapı, eğitim eksikliği nedeniyle sosyoekonomik düzeyin düşük olduğu bölgelerde önemini korumaktadır (8).

Parazit için konak insan ve bazı maymun türleridir. Parazit en sık çekum ve rektosigmoidal bölgeye yerleşir. *E. histolytica*, dört çekirdekli olgun kistlerinin oral yolla, yiyecek ve içeceklerle alınmasıyla bulaşır, bu yolla alınan dört çekirdekli olgun kistin kist duvarı ince bağırsağın son kısmında yok olur ve dört çekirdekli metakist açığa çıkar. Metakist sitoplazması çekirdek sayısına bölünür ve dört metakistik trofozoit ve daha sonra her biri hızlı bir şekilde ikiye bölünerek sekiz trofozoit oluşur. Kistlerde dört çekirdek, glikojen ve kromatoid adı verilen ribozomal yığıntılar

vardır. Bu ribozomal yığıntıların yarıçapları 10-15 µm dir ve kitin içerdiği düşünülen refraktif bir tabakayla çevrilidirler (2). Trofozoitler bağırsak yüzeyinde basit ikiye bölünme ile çoğalarak burayı istila eder. Bilinmeyen bir mekanizmayla önce prekist, kist ve sonra da dört çekirdekli olgun kiste dönüşür. Enfekte bir bireyden kist ya da trofozoit formunda dışkıyla atılırlar (9). Kistlerin atıldığı çevrenin sıcaklığı, nemi ve iyon konsantrasyonu parazitin yaşam döngüsünü etkileyebilmektedir. Barajlar, sulama alanlarının genişlemesi, toprak işleme şeklinin değişmesi, şehirleşme ve sanayileşme başlıca çevresel değişimler olarak sıralanabilir (10). Cd^{+2} , Cu^{+2} , Ba^{+2} ve Co^{+2} metallerinin kistler üzerine öldürücü etkisi olduğu ortaya konmuştur (11). Trofozoitler, kistlere göre çok hareketlidirler, boyutları 10-50 µm arasında değişir. Hareket için gerekli olan enerjiyi glikoz ve piruvatı anaerobik koşullarda yıkarak ve metanole çevirerek elde ederler. Parazitte mitokondri yoktur ve sindirim enzimlerinin büyük kısmı prokaryotik kökenlidir. Bakteriler ile lateral gen değişimleri sonucu evrimsel süreçte bu özelliği kazandıkları düşünülmektedir (2). *E. dispar* da benzeri bir evrim gösterir, ancak sığıntı olarak konağa zarar vermeden yaşamını sürdürür. İmmun yetersiz veya baskılanmış bireylerde yapılan çalışmalarda *E. dispar*'ın yine kommensal yaşadığı histolojik ve serolojik bulgularla gösterilmiştir. *E. histolytica* ve *E. dispar*'ın ayırıcı tanısı, hastalığın ayrımı, tedavi ve prevalans açısından önemlidir (9, 12). Geçmişe ait veriler değerlendirilirken de *E. histolytica* ve *E. dispar* ayrımı yapılmadığı dikkate alınmalıdır (4). Ülkemizde ayrıca *E. moshkovskii* türü de görülmekte ve diğer iki amip türüyle direkt bakıda ayırt edilememektedir. Bu türün tayini nested-PCR ile yapılmış ve Şanlıurfa yöresinde 100 hastadan ikisinde tespit edilmiştir. Her iki hasta diyare, halsizlik ve kilo kaybı şikayetiyle hastaneye başvurmuşlardır (13).

Kültürde çoğaltılan türlerin lizatlarından izoenzim izolasyonu (14) ve ribozomal RNA ve monoklonal antikoları kodlayan genlerin PCR ile çoğaltılması ile iki tür ayırt edilebilmektedir (15-18). İki türün ayırımında farklı sistein proteinazlara sahip olmaları nedeniyle ticari ve uygulama yönünden en uygun yöntem, ELISA yöntemidir (19). *E. histolytica*'lı bazı bireylerde amebik seroloji pozitif olmasına karşın, hastalık asemptomatik olabilir veya bu hastalar prepatent dönemdedir (20). Eritrosit fagosite etmemiş trofozoit saptandığında veya sadece kistlerin görüldüğü örnekler *E. histolytica/dispar* şeklinde raporlandırılmalıdır.

Bu derleme çalışmasında, başta sistein proteinazlar olmak üzere *E. histolytica*'nın patogenezinde rol oynadığı ortaya konan faktörler ve son yıllarda konuyla ilgili yapılan çalışmalardan bazıları ele alınarak bir değerlendirme yapılmaya çalışılmıştır.

Bağırsak Amebiyazında Bulgular

Bağırsak amebiyazında oluşan amebik ülserler rektum, sigmoid kolon ve kolon (öncelikle çekum) da bulunur. Noduler ve irregular olmak üzere iki tip ülser gözlenir. Nodüler ülserler 0,1-0,5 cm çapında kanamalı, etrafı ödemle kaplı nekrotik merkezlerdir ve fazla sayıda bulunurlar. Irregular ülserler ise geniş tabanlı yüzeysel ülserlerdir ve bağırsak yüzeyinde sayıca daha az bulunurlar. Ülser oluşumuyla birlikte bu aşamada bağırsak yüzey mukus tabakasında aşırı incelme ve erozyon gözlenir (21). Mukus tabakasının içeriği parazitin fenotipini, patojenitesini etkilemekte ve sistein proteinaz salgılamasında değişime neden olmaktadır (22). In vitro çalışmalarda parazitte bulunan glukosidaz, hiyaluronidaz, galaktosidaz, mannosidazlar gibi enzimlerin musin-glikoproteinini parçalayarak mukus salgılamasının azalmasına neden olduğu gösterilirken, in vivo çalışmalar bu enzimlerin musin salgılamasında aşırı bir azalmaya neden olmadığını ortaya koymuştur (23). Mukus salgılayan goblet hücrelerinin parazit tarafından sürekli irrite edilmesi ve bu hücrelerin koparak dışkıyla atılmasının bu duruma neden olabileceği düşünülmektedir. Hastanın kliniğinde en önemli belirti olan, kanlı ve mukuslu dışkının görülmesi bu yaklaşımı desteklemektedir (24,25). Bir diğer makroskobik lezyon ise nadir

görülen, kolonda granülatöz bir kitlenin oluşmasıyla karakterize "ameboma" denilen yapılardır. Bu yapılar tanıda kolon kanseriyle karıştırılabilmektedir (26).

Bağırsak amebiyazında oluşan lezyonun gelişimi mikroskobik olarak ele alındığında erken ve geç dönem olarak ikiye ayrılabilir. Parazit istilasının erken döneminde salgı hücrelerinin parazite karşı musin üretimini artırması sonucu mukoza kalınlaşması ve glandular hiperplazi gibi nonspesifik lezyonlar oluşur. Trofozoitlerin epiteli istilası ve yüzeysel ülserler sonucu bağırsak mukus tabakasının erozyonu ve epitel hücrelerinden mediyatörlerin (IL-8, TNF α) salgısı artar (27). Bu aşamada trofozoitlerin etrafı fibrin, musin ve eritrositlerle kaplıdır. Lezyon ilerledikçe parazit lamina propriaya ulaşır ve özellikle bu noktada aşırı nötrofil infiltrasyonu sonucu doku nekrozu oluşmaya başlar (28). Doku nekrozunun oluşmasında nötrofillerin parazit tarafından parçalanması sonucu açığa çıkan mediyatörler büyük rol oynar. Bu nedenle akut inflamasyon hücreleri biyopsi örneklerinde genelde görülmez. Geç dönemde trofozoitler submukozayı istila eder ve ağzı dar, tabanı geniş ülserler ve "şişe belirtisi" ortaya çıkar. Submukozanın parazite direncinin az olması bu belirtinin oluşmasında rol oynar. Bu aşamada nötrofil ve makrofaj infiltrasyonu gözlenir. Trofozoitler musküler tabakaya kadar ilerler ve burada kalırlar. Fakat çok nadiren bu tabakayı aşarak bağırsak delinmesine neden olurlar (29).

Trofozoitlerin epitel dokuyu istilası, hücre ölümünün ve klinik belirtilerin ortaya çıkışının başlangıcıdır. Hücrelerin ölümü nekrotik ve apoptotik olabilir. Nekrotik hücre ölümü bağırsak amebiyazında daha sık görülür ve pore-forming proteinler rol alır. Apoptoz, hedef hücrelerin sinyal iletim mekanizmalarının aktivasyonu ile gerçekleşir ve karaciğer apselerinde daha sıklıkla gözlenir (30).

Hastalığın Patogenezinde Parazit Hareketinin Rolü

Parazitin konak dokuya yayılmasında aktomiyozin iskeleti ve yüzey adezyon molekülleri etkilidir. Hücre iskeleti, hareket, fagositoz ve hücresel bileşenlerin organizasyonunda doğrudan rol alır. *E. histolytica* trofozoitlerinin en dikkat çekici özelliklerinden birisi

bir hücre iskeletini gerektirir. Bu derece hareketli bir hücre iskeletini gözlemlemek oldukça zordur. Ancak hücre iskeletinde bulunan proteinlere spesifik floresan işaretli moleküller ve antikolar eklenerek hareket gözlemlenmektedir. Bu proteinlerin sentezinden sorumlu genlerden bazılarının aminoasit dizilimleri belirlenmiştir. Güncel çalışmalar olayı açıklamakta yetersiz kalmakla birlikte aktin polimerizasyonunda rol alan actin-binding proteinlerin aktin polimerizasyonunu kontrol ettiğini ortaya koymuştur. Adezyon plağı olarak adlandırılan bu komplekslerde aktine ek olarak vinculin, α -actin, myosin I ve II nin bulunduğu tespit edilmiştir. Bu proteinler gelişmiş ökaryotik canlılarda da bulunurlar. Adezyon plaklarında iki kinaz molekülü tanımlanmıştır. Bu kinazlar Protein kinaz C (PKC), serine/threonine kinase ve tirozini fosforilize eden Fokal adezin kinaz (FAK)'dır. Aktin organizasyonunda bu kinazlar fosforilasyon mekanizmalarında rol alarak etkili olurlar. Parazitin hareketi aktin proteini- nin dinamik etkileşimleriyle gerçekleşir, yalancı ayak uzatılır, hedef hücreye tutunur ve son olarak hücrenin geri kalan kısmı ileri itilerek hareket tamamlanır. Profilin aktin polimerizasyonunu aktive ve inhibe edebilen bir moleküldür. Bu protine ek olarak kofilin ve aktin depolimerizasyon faktörü (ADF) aktin depolimerizasyonunda rol alır (31).

Amebiyazda Klinik Belirtiler, Tanı ve Tedavi

Bağırsak yüzeyindeki *E. histolytica* infeksiyonları genellikle asemptomatik seyreder, parazitin yerleştiği bireylerin %85-90'nda herhangi bir klinik belirti ortaya çıkmaz (1). Klinik belirtiler, parazitin bağırsak duvarını aşmasıyla ortaya çıkar. Bağırsak amebiyazlı hastalarda en sık ishal, kanlı dışkılama, karın ağrısı ve kilo kaybı görülür (6). Genellikle ateş ve sistemik belirtiler görülmez. Bu yönüyle bakteriyel kaynaklı dizanteriden rahatlıkla ayrılabilir. Parazitin karaciğere yerleştiği durumlarda ise; sağ üst kadranda ağrı, kilo kaybı, öksürük, ishal, ateş, titreme, terleme, iştahsızlık, mide bulantısı görülür (32).

Ayrıca bu hastalarda ağırlı karaciğer büyümesi vardır, karaciğer yüzeyi kanser ve sirozun aksine yumuşaktır.

E. histolytica tanısında taze dışkı örneğinde trofozoitlerin ve kistlerin, rektosigmoidoskopi ile alınan

örnekte trofozoitlerin belirlenmesinin yanı sıra serolojik testlerden ELISA, İHA, İİF ve pahalı bir yöntem olmakla birlikte özellikle bağırsak dışı amebiyaz tanısında tomografi kullanılabilir (4, 33). Dışkıda Charcotleyden kristallerinin görülmesi de *E. histolytica* şüphesini artırmalıdır. Enfeksiyonun endemik olduğu bölgelerde yaşayanlarda anti-amebik antikor oluşumunun yüksek olmasına rağmen CDC (Center for Disease Control and Prevention) tarafından tanıda ELISA önerilmemektedir (1, 32). Bağırsak amebiyazının tedavisinde metranidazol, bağırsak dışı amebiyaz tedavisinde emetin en sık kullanılan ilaçlardır. Alternatif olarak bağırsak amebiyazı tedavisinde secnidazole, tinidazole, ornidazole, niridazole kullanılabilir. Dokularda yerleşen amiplerin tedavisinde dehidroemetin, chloroquine diğer seçeneklerdir (9).

Patogeneizde Rol Alan Virulans Faktörleri

Parazitin konak dokuyu istilası, hücre ölümü, konak immün sisteminin modifikasyonunda rol alan mekanizmalar ve proteinler virulans faktörleri olarak adlandırılır. Parazitin konağa zarar verme sürecinde bağlanma, sitoliz ve fagositoz aşamaları vardır. Bu üç aşama birlikte parazitin patojenitesi olarak adlandırılır (34). Parazitin virulans faktörlerinin araştırılmasında öne çıkan başlıca yaklaşımlara bakıldığında, non-patojen ve patojen tür arasındaki farklılıklar önemli bir yer tutmaktadır. Parazitlerin biyokimyalarının ve patojenitelerinin açıklanmasında kültür çalışmaları aydınlatıcı olmuştur (35). Bununla birlikte hayvan modellerinin geliştirilmesi, in vitro olarak elde edilen sonuçların in vivo gerçekleşip gerçekleşmediğinin gözlenmesi açısından önemlidir.

Antisens oligonükleotidler hedef gen bölgesine komplementer olan ve ekspresyonunu durduran sentetik nükleik asit molekülleridir. Bu moleküller hedef proteinin sentezi durdurularak görevinin anlaşılmasında büyük gelişmeler sağlamıştır. Antisens (gen inhibisyonu) yöntemlere benzer şekilde gerçekleştirilen gen silencing (gen susturulması) çalışmalarıyla da genomik seviyede bloke edilen proteinlerin virulansdaki rolleri araştırılmaktadır. 2006 yılı itibarıyla *E. histolytica* genomu dizilenmiş ve *E. dispar* genomu dizilemesi devam etmektedir (1). Genomun dizilenmesi sonucu *E. histolytica* genomunda transkripsiyona uğratılama-

yan mRNA ların bulunduğu ve bunların büyük kısmının SINEs (EhSINE1-3) ailesindeki genlerle sentezlendiği ortaya konmuştur. *E. dispar* genomunda yapılan çalışmalarla uçları büyük oranda *E. histolytica*'dakilere benzeyen fakat orta kısımları farklı yüksek miktarda SINE elementinin olduğu ortaya konmuştur (36). Tüm bu çalışmalar sonucunda *E. histolytica* virulans faktörleri dört ana grupta toplanmıştır; galaktoz N-asetil galaktozamin, amebaporlar, sistein proteinazlar ve lipopfosopeptidoglikan kompleksleri.

Galaktoz N-asetil galaktozamin ve aynı grupta yer alan adezin molekülleri integrin protein ailesinden, trofozoitin epitel hücrelere bağlanmasından sorumlu virulans faktörleridir (37,38). Hedef hücrenin galaktozamin reseptörüne bağlanarak fonksiyon görürler. Ayrıca sitoliz, konak doku istilası, kompleman ataklarından korunmada ve büyük ihtimalle parazitin enkistasyonunda da rol alırlar (37). *E. histolytica* ve *E. dispar*'dan izole edilen galaktoz N-asetil galaktozamin molekülleri karşılaştırıldığında birincil protein yapılarının %79 oranında gen dizilimlerinin %86 oranında benzer olduğu ortaya konmuştur (39). Deney hayvanlarında *E. dispar*'ın bağırsak epitel yüzeyine bağlanarak epitel erozyonuna neden olabildiği bu benzerliğe paralel olarak gösterilmiştir.

E. histolytica trofozoitleri tarafından salınan amebaporlar küçük amfipatik peptitlerdir (21). Ökaryotik ve bakteriyel hücre zarına entegre olarak zar geçirgenliğini bozarlar ve nekrotik yoldan hücrenin ölümüne neden olurlar (40,41). T hücrelerindeki perforin proteinine benzer fonksiyon görürler (42). Negatif yüklü fosfolipidlere lizin ucuyla bağlanır ve hemen membrana entegre olur. Hedef inflamasyon hücreleri lenfositler, PMNL (poli morfo nüklear lökosit) ve makrofajlar kontrolsüz su, iyon ve küçük moleküllerin geçişiyle şişer ve lizis olur. Amebapor proteinlerin en önemlisi olan Amebapor A kendine özgü bir şekilde aktive olur. Histidin aracılığıyla proteinin dimerizasyonu, hedef hücre membranında oligomerik deliklerin oluşmasında bir anahtar görevi görür. Bu protein 16 yıl önce izole edilmiş ve primer yapısı ortaya çıkarılmıştır. 2005 yılında üç boyutlu yapısı aydınlatılan proteinin insan saposin protein ailesine benzediği ortaya konmuştur (40). Epigenetik gen silencing yöntemiyle amebapor protein ekspresyonu azaltılan suşların vi-

rulansının azaldığı görülmüştür (43). *E. dispar*'da da benzer proteinler bulunur fakat *E. dispar*'ın bu proteinleri sadece bakterileri sindirmek için kullandığı, konak dokuyu istila etmediği sanılmaktadır. Bu yönüyle amebaporların antibakteriyel olarak kullanılabileceği düşünülebilir.

Sistein proteinazlar birçok ökaryotik canlıda bulunur, insandaki homoloğu katepsin proteindir. Parazitin patojenitesinde rol alan en önemli virulans faktörüdür (44,45). Ekstrasellular matris proteinlerinden kollojen, elastin, fibrinojen, laminini yıkarak parazitin yayılmasını kolaylaştırır (46,47). Konak immün sisteminin baskılanmasında ve modifikasyonunda rol alır. IgA, IgG, anafilatoksin C3a ve C5a'yı azalttığı deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. IgA oluşumunu azaltması karaciğer apsesinde nötrofil infiltrasyonunu geciktirmektedir (48). Ayrıca epitel hücre istilası sırasında epitellerden salınan proinfilamatuvar araçların değişimine ve nekroz oluşumuna neden olur. Konaktan salınan kompleman ataklarına karşı paraziti korur. Sistein proteinazların, parazitin bağırsak dışı yerleşiminde de rol aldığı bilinmektedir. EhCP1, EhCP2 ve EhCP5 *E. histolytica*'da en fazla sentezlenen sistein proteinazlardır ve bunlardan ikisinin *E. dispar*'da bulunmadığı Southern-Blotting analizi ile gösterilmiştir (43). EhCP5 sistein proteinaz antisense ile %90 inhibe edilmiş, Diamond's TYI-S-33 besiyerinde normal büyüme göstermiş, sitopatik ve hemolitik aktivitesi değişmemiş fakat fagositoz yeteneği büyük oranda azalmıştır (49). Ayrıca SCID fare ve hamsterlerde sistein proteinazların antisens inhibisyonu sonucunda karaciğer apsesinin oluşmadığı gözlenmiştir (50). Bu çalışmalara paralel olarak sistein proteinaz inhibitörlerinin parazitin tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Parazit kendi sistein proteinazlarından, sistein proteinaz inhibitörü olan sistatin ile korunmaktadır. Ayrıca proteinazları inaktif prekürsörler olarak sentezler ve salgılar (51). E-64, *Aspergillus japonicum*'dan izole edilen bir sistein proteinaz inhibitörüdür. Parazitin tedavisinde etkili olmakla birlikte hücreye penetrasyonu yeterli olmamaktadır (52). Sistein proteinazlar birçok parazitin yaşam döngüsünde ve patogeneğinde rol alır (53). *Giardia* trofozoitlerinin enkistasyonunda, *Leishmania*'ların promastigotdan amastigota dönüşümünde, *Trypa-*

nasoma ve *Plasmodium*'ların yaşam döngüsünde rol aldığı ortaya konulmuştur. *E. histolytica* genomunda proteinazları (peptidaz) kodladığı düşünülen 86 gen bölgesi tanımlanmıştır. Tanımlanan genlerden 50'si sistein peptidaz, 22'si metallo peptidaz, 10'u serin peptidaz ve dördü aspartik peptidazdır (54). Ayrıca in vitro çalışmalarda *E. invadens*'in enkistasyonunu etkilediği bilinmektedir (45).

Adezyon molekülü ve hücre iskeleti arasındaki ilişki parazitin patogeneğinde önemlidir. Parazit submukozaya ulaştığında ekstraselüler matriks proteinleriyle karşılaşır. Bu etkileşim aktin polimerizasyonunda, harekette, fosfokinaz A sinyal mekanizmasında değişimi tetikler; karbohidrat hidrolaz salınımı artar. Bu enzimlerin oligosakkaritlerini, membrana bağlı asit fosfatazlarının salınımını azaltarak konak hücre iskeletinin yıkımını kolaylaştırmaktadır. Ayrıca trofozoit yüzeyinde lizin ve glutamik asitçe zengin proteinlerin (KERPs) konak hücreye bağlanmada rol aldığı görülmüş ve fibronektine bağlanan BspA proteini tanımlanmıştır. Bir çalışmada galaktoz/N-asetilgalaktozamin (Gal/GalNAc) lektin aracılığıyla parazitin enterositlere bağlandığı ve bu proteinin bozuk olduğu suşlarda enterositlere bağlanma yeteneklerinin azaldığı ortaya konmuştur. Miyozin II aktivitesi inhibe edilen suşun bu fonksiyonu yerine getiremediği ve karaciğer apsesine neden olmadığı gösterilmiştir (38).

Lipofosfopeptidoglikan yüzey kompleksleri kana ve karaciğere gelen paraziti kompleman ataklarından korumaktadır. Ayrıca peroksiredoksin, proteazlar, lektin de kompleman ataklarından korunmada rol alırlar (55).

E. histolytica infeksiyonlarında ortaya konulan bağlanma, lizis ve beslenme modelinde parazitin hedef hücreye lektinler ile bağlanarak, lizisine neden olduğu ortaya konmuştur (56,57). Parçalanmış hücreler inflamasyonu tetiklemekte ve fagositler hücrelerin bölgeye infiltrasyonuna neden olmaktadır. Bölgeye gelen fagositler hücreler parazit tarafından sindirilir, ayrıca eritrositler *E. histolytica* için demir kaynağıdır (58). *E. dispar* için besin kaynağı bakterilerdir. Bağlanma ve lizis modeli olarak adlandırılan modelin yetersiz olduğu noktalar bulunmaktadır. İnflamasyonun önemli olması ve karaciğerde az sayıda trofozoitin çok fazla hepatositin ölümüne neden olmasını bu mo-

delle açıklamak zordur ve yeni çalışmaların gerekli olduğunu ortaya koymaktadır.

Amebiyazda İnflamasyon

İnflamasyon oluşması bağırsak amebiyazında önemli bir olaydır. Bakteriyal infeksiyonlarda ilk olarak epitel hücrelerinden salınan kemokinler, nötrofil ve makrofaj infiltrasyonunu tetikler. In vitro çalışmalarda *E. histolytica* ile infekte edilen insan hücre kültüründe, infeksiyonlara benzer şekilde IL-8, growth related antigen, granülosit-makrofaj koloni stimülasyon faktörü, IL-6, IL-1α'nın sentezinin arttığı görülmüştür. In vitro çalışmalarda sitokin üretiminin IL-1α üzerinden kontrol edildiği, ek olarak IL-8 salınımında galaktoz- inhibe eden lektin ile trofozoitin hedef hücreye bağlanması sonucunda hücre içi kalsiyum seviyesindeki değişimin rol oynadığı ortaya konmuştur (59). Bu durumun in vivo olarak gerçekleşip gerçekleşmediğini gözlemlemek için insan bağırsak ksenograftı içeren immün baskın farede çalışmalar yapılmıştır (60). Bu yöntemin avantajı inflamasyon oluşmasına neden olan sitokinlerin insan bağırsak epitelini kaynaklı, makrofaj ve nötrofillerin fare kaynaklı olmasıdır. Bu sayede insan ve fare sitokinlerine spesifik sitokinlerin nereden salındığı immünoflora moleküllerle anlaşılabilir (61). Yapılan çalışmalar sonucunda epitel hücrelerinden IL-1B'nin 50 kat, IL-8'in altı kat arttığı gözlenmiştir ve inflamasyonun başlamasında epitelten salınan sitokinlerin rol aldığı sonucuna varılmıştır (60).

İnflamasyonda rol alan diğer bir molekül nükleer faktördür. Nükleer faktör (NF) sitokinlerin üretimini kontrol eden transkripsiyon faktörüdür. Bu molekülün *E. histolytica* infeksiyonlarındaki rolünü açıklamak için antisense nükleik asit parçaları ile NF leri inhibe edilmiş insan bağırsak ksenograftı içeren fare, daha sonra parazit ile enfekte edilmiş ve IL-1B ve IL-8B salınımında azalma olduğu ve inflamasyon oluşumunun azaldığı görülmüştür (62).

Nükleer faktöre yönelik bir diğer araştırmada ise bağırsak geçirgenliği test edilmiştir. Protozoon infeksiyonlarında bağırsak geçirgenliği artmaktadır (63). İnflamasyon ve devamında meydana gelen doku hasarlığı sonucu bağırsak geçirgenliği bozulmaktadır. Nükleer faktör antisense inhibisyonunda bağırsak ge-

çirgenliğinin bozulmadığı gözlenmiş ve nükleer faktörün inflamasyonda önemli bir rolü olduğu ve inflamasyon olmazsa doku harabiyetinin gerçekleşmeyeceği sonucuna varılmıştır (64).

Nötrofiller *E.histolytica* infeksiyonlarında en erken rol alan inflamasyon hücreleridir. Nötrofillerin parazit tarafından parçalanması sonucu süperoksidad, elastaz, kollogenaz, katepsin gibi toksik maddeler ortaya çıkar (65). İnflamasyonda nötrofillerin rolüne yönelik bir çalışmada nötrofenik fareler parazit ile infekte edilmiş ve doku harabiyeti geçirgenlik testiyle araştırılmıştır (64). Nötrofil yönünden yetersiz farede bağırsak geçirgenliğinin daha az değiştiği ve nötrofillerin parazit tarafından sindirimi sonucu açığa çıkan aracılardan doku harabiyetine neden olduğu bu çalışma sonunda da ortaya konmuştur. *E. dispar* ile infekte edilen hamster modellerinde ise nötrofillerin bu türü 24 saat içerisinde ortadan kaldırdığı belirlenmiştir. Bu durum, iki türün patojenik karakterlerinin farklı olması ile açıklanmıştır (66).

İnflamasyonda sistein proteinazların rolüne yönelik yapılan bir çalışmada sistein proteinaz enzimlerini antisense ile (%80-90) inhibe edilen *E. histolytica* suşu

ile SCID-HU-INT fareler infekte edilmiş ve parazitin bağlanması bir sorun olmadığı fakat inflamasyon oluşmadığı gözlenmiştir (49).

Özellikle karaciğer amibik apsesinde *E. histolytica*, nekrotik hücre ölümünden çok, programlı hücre ölümüne neden olmaktadır (67). Bu durum az sayıdaki trofozoitin çok sayıda hepatositi öldürebilmesini açıklamaktadır *E. histolytica* infeksiyonlarında programlı hücre ölümü normalden farklı olmaktadır. Karaciğer amibik apsesinde apoptoz mekanizması, insanda gerçekleşen normal mekanizmadan farklı olarak Bcl-2 ile inhibe olmamakta ve hücre ölümü Fas-TNF alfa birleşmesine gerek olmadan gerçekleşmektedir (68).

Apoptotik hücre ölümünün nasıl olduğu, hedef organa göre parazitin farklı etki göstermesinin nedenleri, açıklanması gereken diğer konulardır. Bu konuda iki görüş öne sürülmektedir. İlki parazitin hedef organa göre virulans faktörlerini düzenlemesi, diğeri ise hedef organların tepkilerinin farklı olmasıdır. Gelecek yıllarda ucuz ve etkili bir ilaç olan 5-nitroimidazole karşı direnç gelişebileceği de göz önünde bulundurulmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Ackers PJ, Mirelman D. Progress in research on *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9(4):367-73.
2. Stanley SL. Amoebiasis. *Lancet* 2003; 361:1025-34.
3. Diamond LS, Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (emended walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* (Brumpt, 1925). *J Eukaryot Microbiol* 1993; 40: 340-4.
4. Tanyüksel M, Petri WA. Laboratory diagnosis of amebiasis. *J Clin Microbiol* 2003; 16(4): 713-29.
5. Malatyalı E, Özçelik S, Çeliksöz A, Değerli S, Yıldırım D. The frequency of intestinal parasites in primary school children in urban and rural regions. *T Parazit Derg* 2008; 32(1): 54-8.
6. Oğuztürk H, Çeliksöz A, Özçelik S. Amebiyoz ve blastosistosis'de gastrointestinal semptomların görülme sıklığı. *T Parazit Derg* 25(1): 28-30, 2001.
7. Tanyüksel M, Yılmaz H, Ulukanlıgil M, Araz E, Cicek M, Koru O, Tas Z, Petri WA Jr. Comparison of two methods (microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of amebiasis. *Exp Parasitol* 2005; 110(3): 322-36.
8. Özçelik S, Oğuztürk H, Değerli S, Çeliksöz A, Aygan Ç, Saygılı İ, Uygur B, Kıvanç Ö. Sivas Merkez ve çevre ilçelerin bazılarında ilköğretim çağı çocuklarında bağırsak parazitlerinin yaygınlığı. *T Parazit Derg* 2001; 25(1): 56-8.
9. Özcel MA. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. 1.Baskı. İzmir: Meta Basım,2007: 285..
10. Ak M, Keleş E, Karacasu F, Pektaş B, Akkafa F, Özgür S, Şahinöz S, Özçırpıcı Ö, Bozkurt Aİ, Şahinöz T, Saka E, Ceylan A, İlçin E, Acemioğlu H, Palancı Y, Gül K, Akpınar N, Jones T, Özcel M. The distribution of the intestinal parasitic diseases in the Southeast Anatolian (GAP=SEAP) region of Turkey. *Parasitol Res* 2006; 99(2): 46-52.
11. Aksoy U, Üstün S, Dağcı H, Yazar S. Effects of Cd⁺², Cu⁺², Ba⁺² and Co⁺² ions on *Entamoeba histolytica* cysts. *World J Gastroenterol* 2004; 10(3): 449-51.
12. Doganci L, Tanyüksel M, Doganci M. Accurate diagnosis is essential for amebiasis. *World J Gastroenterol* 2004; 10(8):1231.
13. Tanyüksel M, Ulukanlıgil M, Güçlü Z, Araz E, Koru O, Petri WA. Two cases of rarely recognized infection with *Entamoeba moshkovskii*. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 76(4): 723-4.

14. Sargeant PG, Williams JE, Greene JD. The differentiation of invasive and noninvasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1978; 72:519-21.
15. Reed SL, Flores BM, Batzer MA, Stein MA, Stroehrer VL, Carlton JE, Diedrich DL, Torian BE. Molecular and cellular characterization of the 29-kDa peripheral membrane protein of *Entamoeba histolytica*: differentiation between pathogenic and nonpathogenic isolates. *Infect Immun* 1992; 60: 542-9.
16. Strachan, WD, Spice WM, Chiodini PL, Moody AH, Ackers JP. Immunological differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. *Lancet* 1988; 29(2): 250-5.
17. Tannich E, Burchard GD. Differentiation of pathogenic from nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified in vitro. *J Clin Microbiol* 1991; 29(2): 250-5.
18. Dağcı H, Erdoğan DD, Toz SO, Kurt O, Üstün S, Akarca U. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* by PCR: a preliminary study in Izmir, Turkey. *New Microbiol* 2007; 30(1):45-8.
19. Haque R, Neville L, Hahn P, Petri WA. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. *J Clin Microbiol* 1995; 33(10): 2558-61.
20. Gatriham V, Jackson TFHG. A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. *S Afr Med* 1987; 172:669-72.
21. Stanley SL. Pathophysiology of amoebiasis. *Trends in Parasitology* 2001; 17(6):280-5.
22. Debnath A, Tashker JS, Sajid M, McKerrow JH. Transcriptional and secretory responses of *Entamoeba histolytica* to mucins, epithelial cells and bacteria. *Int J Parasitol* 2007; 37(8-9):897-906.
23. Spice WM, Ackers JP. The effects of *Entamoeba histolytica* lysates on human colonic mucins. *J Eukaryot Microbiol* 1998; 45: 24-27.
24. Moncada D, Keller K, Chadee K. *Entamoeba histolytica*-Secreted products degrade colonic mucin oligosaccharides. *Infection and Immunity* 2005, 73(6): 3790-3.
25. Belley A, Keller K, Göettke M, Chadee K. Intestinal mucins in colonization and host defense against pathogens. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60:10-5.
26. Agrez M, Karihaloo C, Reeves G, Puvaneswary M, Sturm L, Scurry J. Rectal cancer masquerading as an amoeba: case report and review of the literature. *ANZ Journal of Surgery* 2004; 74 (9):812-5.
27. Kasper LH, Buzoni-Gatel B. Ups and downs of mucosal cellular immunity against protozoan parasites. *Infect Immun* 2001 ; 69(1): 1-8.
28. Shibayama M, Navarro-Garcia F, López-Revilla R, Martínez-Palomo A, Tsutsumi V. In vivo and in vitro experimental intestinal amebiasis in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Parasitol Res*, 1997; 83: 170-6.
29. Agrez M, Karihaloo C, Reeves G, Puvaneswary M, Sturm L, Scurry J. Rectal cancer masquerading as an amoeba: case report and review of the literature. *ANZ Journal of Surgery*, 2004; 74 (9):812-5.
30. Marion S, Guillen N. Genomic and proteomic approaches highlight phagocytosis of living and apoptotic human cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol* 2006; 36:131-9.
31. Meza I, Talama's-Rohana P, Vargas MA. The cytoskeleton of *Entamoeba histolytica*: Structure, function, and regulation by signaling pathways. *Arch Med Res* 2006; 37(2):234-3.
32. Espinosa-Cantellano M, Martinez-Palomo A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: From molecules to disease. *Clinical Microbiology Reviews* 2000; 13(2): 318-31.
33. Saygı G, Özçelik S, Temizkan N. Amöbiyaz şüpheli olguların serumlarında indirekt hemagglütinasyon deneyi ile saptanan bulgular. *T Parazitol Derg* 1990; 14(1): 13-6.
34. Boettner DR, Petri WA. *Entamoeba histolytica* activates host cell caspases during contact-dependent cell killing. *Curr Trop Microbial Immunol* 2005; 289:175-84.
35. Özçelik S, Saygı G. Protozoonların kültüründe soya fasüyesinden hazırlanan besiyerlerinin kullanımı II. *KÜ-KEM Derg* 1986; 9(1): 21-5
36. Shire AM, Ackers JP. SINE elements of *Entamoeba dispar*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2007; 152(1): 47-52.
37. Mann BJ. Structure and function of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin. *Int Rev Cyt* 2002; 216: 59-80.
38. Tavares P, Rigotherier MC, Khun H, Roux P, Huerre M, Guillen N. Roles of cell adhesion and cytoskeleton activity in *Entamoeba histolytica* pathogenesis: A delicate balance. *Infect Immun*, 2005; 73(3): 1771-8.

39. Dodson JM, Clark CG, Lockhart LA, Leo BM, Schroeder JW, Mann BJ. Comparison of adherence, cytotoxicity, and Gal/GalNAc lectin gene structure in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Parasitol Int* 1997; 46: 225-35.
40. Leippe M, Bruhn H, Hecht O, Grotzinger J. Ancient weapons: the three-dimensional structure of amoebapore A. *Trends Parasitol* 2005; 21(1):5-7.
41. Leippe M. Amoebapores. *Parasitol Today* 1997; 13: 178-83.
42. Tschopp J, Nabholz M. Perforin-mediated target cell lysis by cytotoxic T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, 1990; 8: 279-83.
43. Bruchhaus I, Jacobs T, Leippe M, Tannich E. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. *Mol Microbiol* 1996; 22: 255-63.
44. Lushbaugh WB, Hofbauer AF, Pittman FE. *Entamoeba histolytica*: purification of cathepsin B. *Exp Parasitol*, 1985; 59:328-36.
45. Que X, Reed SL. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amoebiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 2000; 13(2): 196-06.
46. Keene WE, Pettit MG, Allen S, McKerrow JH. The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 1986; 163:536-49.
47. Luaces AL, Barrett AJ. Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Biochem J* 1988; 250:903-9.
48. Reed SL, Ember JA, Herdman DS, DiScipio RG, Hugli TE, Gigli I. The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. *J Immunol* 1995; 155: 266-74.
49. Ankri S, Stolarsky T, Mirelman D, 1998. Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Mol Microbiol*, 1998; 28(4): 777-85.
50. Ankri S, Stolarsky T, Bracha R, Padilla-Vaca F, Mirelman D. Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases affects *Entamoeba histolytica*-induced formation of liver abscess in hamsters. *Infection and Immunity* 1999; 67(1):421-2.
51. Karrer KM, Peiffer SL, DiTomas ME. Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine proteinase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3063-7.
52. Stanley SL, Zhang T, Rubin D, Li E. Role of the *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. *Infect Immun* 1995; 63: 1587-9.
53. Robertson CD, Coombs GH, North MJ, Mottram JC. Parasite cysteine proteinases. *Perspect Drug Discov Des*, 1996; 6: 99-118.
54. Tillack M, Biller L, Irmer H, Freitas M, Gomes MA, Tannich E, Bruchhaus I. The *Entamoeba histolytica* genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes. *BMC Genomics*, 2007; 8(1): 170.
55. Moody S, Becker S, Nuchamowitz Y, Mirelman D. Identification of significant variation in the composition of Lipophosphoglycan-like molecules of *E. histolytica* and *E. dispar*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 1998; 45(2): 9-12.
56. McCoy JJ, Mann BJ, Petri WA. Adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* or how lectins let parasites stick around. *Infect Immun* 1994; 62: 3045-50.
57. Vines RR, Ramakrishnan G, Rogers JB, Lochart LA, Mann BJ, Petri WA. Regulation of adherence and virulence by the *Entamoeba histolytica* lectin cytoplasmic domain, which contains a B2 integrin motif. *Mol Biol Cell* 1998; 9: 2069-79.
58. Serrano-Luna JJ, Negrete E, Reyes M, Garza M de la. *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS: hemoglobin-degrading neutral cysteine proteases. *Exp Parasitol*, 1998; 89: 71-7.
59. Eckmann L, Reed SL, Smith JR, Kagnoff MF. *Entamoeba histolytica* trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1 α . *J Clin Invest*, 1993; 96(3):1269-79.
60. Seydel KB, Li E, Swanson PE, Stanley SL Jr. Human intestinal epithelial cells produce proinflammatory cytokines in response to infection in a SCID mouse-human intestinal xenograft model of amebiasis. *Infect Immun*, 1997; 65: 1631-9.
61. Savidge TC, Morey AL, Ferguson DJ, Fleming KA, Shmakov AN, Philips AD. Human intestinal development in a severe-combined immuno deficient xenograft model. *Differentiation*, 1995; 58: 361-71.
62. Neurath MF, Pettersson S, Büschenfende KHMZ, Strober W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF- κ B abrogates

- established experimental colitis in mice. Nat Med 1996; 2: 998-1000.
63. Dağcı H, Üstün Ş, Taner MS, Ersöz G, Karacasu F, Budak S. Protozoon infections and intestinal permeability. Acta Tropica, 2002; 81(1):1-5.
64. Seydel K B, Li E, Zhang Z, Stanley SL Jr. Epithelial cell-initiated inflammation plays a crucial role in early tissue damage in amebic infection of human intestine. Gastroenterology, 1998; 115: 1446-53.
65. Guerrant RL, Brush J, Ravdin JI, Sullivan JA, Mandell GL. Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. J Infect Dis, 1981; 143: 83-93.
66. Espinosa-Cantellano M, Castañón Gutiérrez G, Martínez-Palomo A. In-vivo pathogenesis of *Entamoeba dispar*. Arch Med Res, 1997; 28: 204-20.
67. Seydel KB, Stanley SL Jr. *Entamoeba histolytica* induces host cell death in amebic liver abcess by a non-Fas-dependent, non-tumor necrosis factor α -dependent pathway of apoptosis. Infect Immun 1998; 66: 2980-3.
68. Ragland BD, Ashley LS, Vaux DL, Petri WA. *Entamoeba histolytica*: Target cells killed by trophozoites undergo DNA fragmentation which is not blocked by Bcl-2. Exp Parasit 1994; 79: 460-67.